

• 临床检验研究论著 •

男性不育症患者精子凋亡率分析*

石汉振¹, 彭安平¹, 钟金柳²

(1. 广东省中医院, 广东广州 510120; 2. 广东医学院检验系, 广东广州 524023)

摘要:目的 探讨精子凋亡对男性不育症的影响。方法 使用西班牙 SCA 计算机辅助精液分析仪及改良巴氏染色法对 52 例精液标本进行检测, 其中 36 例为男性不育症患者精液标本, 16 例为正常生育男性的精液标本。精液分析的参数包括精子密度、前向运动精子百分率(PR%)、正常形态率, 并使用流式细胞术检测患者精子凋亡的情况。结果 少精子症组的精子凋亡率为(27.0±11.2)%, 弱精子症组的精子凋亡率为(16.8±9.8)%, 精子畸形组的精子凋亡率为(23.0±9.9)%, 分别与相应的对照组进行比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 不育症组与正常生育组的精子凋亡率分别为(16.0±7.5)%、(8.4±9.4)%, 差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 精液质量不佳患者其精子凋亡率较高, 这可能是直接影响患者生育结局的一个重要因素。

关键词:不育; 男性; 精子; 细胞凋亡; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)04-0392-02

Spermatozoa apoptosis ratio analysis on patients with male infertility*

Shi Hanzhen¹, Peng Anping¹, Zhong Jinliu²

(1. Clinical Laboratory Department of Guangdong Provincial hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Medical Inspection Department of Guangdong Medical College, Guangzhou, Guangdong 524023, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of sperm apoptosis on male infertility. **Methods** Semen from 52 patients were analyzed for mainly analysis parameters (including sperm concentration, PR%, the normal sperm morphology rate) using Spain SCA computer assisted semen analyzer. And flow cytometry in combination with FITC Annexin V/PI fluorescence staining were adopted for sperm apoptosis detection. **Results** Different male infertility patients had different sperm apoptosis rate(%). Sperm less apoptosis rate was (27.0±11.2)%; sperm weak apoptotic rate was (16.8±9.8)%; sperm malformation rate of apoptosis was (23.0±9.9)%. There were significant difference between the disease group and normal control group ($P<0.05$). **Conclusion** Poor semen quality in patients accompanied with abnormal apoptosis rate, may have a direct impact on birth outcomes in patients.

Key words: infertility, male; spermatozoa; apoptosis; flow cytometry

凋亡是指细胞在生物体发育过程中或在某些因素作用下, 通过细胞内基因及其产物的调控而发生的一种程序性细胞死亡。人体细胞在正常情况下其更新处于良性动态平衡中, 如果平衡被破坏, 人体将出现异常病理表现。因此, 研究细胞凋亡的机制, 可以发现检测或治疗多种疾病的新方法, 具有不可估量的前景^[1]。精子凋亡的检测方法有 TdT 介导缺口末端原位标记法(TUNEL)检测^[2]、线粒体膜电位检测、原位标记、精子染色质结构分析(SCSA)、单细胞凝胶电泳法(SCGE)法等。但是这些方法存在操作繁琐、主观性大的问题, 不宜作为常规检测的项目^[3]。本研究采用流式细胞术结合异硫氰酸荧光素(FITC)-Annexin V/PI 荧光染色的方法, 对精子凋亡率进行了定量检测, 以探讨精子凋亡对患者生育能力的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取广东省中医院 2012 年 3~12 月诊断为男性不育症的患者 36 例, 年龄(30.1±4.3)岁, 作为不育症组; 另选取进行精液检查的婚后 2 年正常生育的男性 16 例, 年龄(29.0±5.0)岁作为正常生育组。男性不育症的诊断按《世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册》^[4]中的标准进行。分组情况: 根据《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第 5 版)》^[5]中的正常参考区间, 即精子密度大于或等于

15×10⁶/mL、伊红染色大于或等于 58%、PR%≥32%、正常形态率大于或等于 4%, 将 52 例受检者按精子密度分为少精子症组和精子密度正常组, 按前向运动精子百分率(PR%)分为弱精子症组和 PR%正常组, 按正常形态率分为精子畸形组和精子形态正常组。

1.2 仪器与试剂 FITC 标记的 Annexin V 细胞凋亡试剂盒, 购自嘉美生物公司; 0.9%生理盐水由广东省中医院提供; BD FACSCALIBUR 流式细胞仪由 BD 公司生产。西班牙 SCA 计算机辅助精液分析仪由西班牙 Microptic 公司生产。

1.3 方法 精子密度、PR%使用西班牙 SCA 计算机辅助精液分析仪进行检测; 精子正常形态率使用改良巴氏染色法检测; 凋亡率使用流式细胞术进行检测。精子凋亡率检测严格按照试剂盒说明书进行。标本收集及处理: 要求受检者禁欲 2~7 d, 手淫法收集全部精液, 进行精液常规分析后, 将标本加入等量生理盐水, 300×g 离心 10 min, 洗涤后, 冻存于-80℃冰箱待检。

1.4 实验室质量控制 精液分析、形态分析和凋亡率测定均由同一位有多年操作经验的检验人员独立完成。精子密度、PR%采用计算机辅助分析系统于收集后 1 h 内在 37℃恒温条件下分析。每次检测至少随机采集 10 个以上分离视野, 计数 200 个

* 基金项目: 广东省人口和计划生育委员会资助项目(2011KT2086)。 作者简介: 石汉振, 男, 主管技师, 主要从事临床检验及男科检验工作。

以上的精子,每样本检测 2 次并取平均值。流式细胞仪测定精子凋亡率,设定阴、阳性对照。将正常精液作为阴性对照,用氨甲蝶呤诱导精子凋亡(即接触 6 h)的精液作为阳性对照^[6]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

少精子症组凋亡率为(27.0±11.2)%,弱精子症组凋亡率为(16.8±9.8)%,精子畸形组凋亡率为(23.0±9.9)%,分别与相应的作为对照的正常组进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);正常生育组与不育症组的凋亡率分别为(16.0±7.5)%、(8.4±9.4)%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1~4。

表 1 不同精子密度组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	精子密度($\times 10^6$ /mL)	凋亡率(%)
少精子症组	40	13.4±1.8	27.0±11.2*
精子密度正常组	12	99.7±77.7	12.7±7.9

*: $P < 0.01$,与精子密度正常组比较。

表 2 不同 PR%组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	PR%	凋亡率(%)
弱精子症组	36	38.2±11.8	16.8±9.8*
PR%正常组	16	67.5±9.0	8.9±8.8

*: $P < 0.01$,与 PR%正常组比较。

表 3 不同精子形态组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	精子正常形态率(%)	凋亡率(%)
精子畸形组	8	3.5±0.8	23.0±9.9*
精子形态正常组	44	12.7±5.6	11.8±7.3

*: $P < 0.01$,与精子形态正常组比较。

表 4 不同生育结局组间凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	年龄(岁)	凋亡率(%)
不育症组	36	30.1±4.3 [△]	16.0±7.5*
正常生育组	16	29.0±5.0	8.4±9.4

*: $P < 0.01$,与正常生育组比较;[△]: $P > 0.05$,与正常生育组比较。

(上接第 391 页)

组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的实用型 HCMV 特异性免疫学检测试剂盒。

参考文献

[1] Jose J,Garcia-Ramirez G,Ruchti F. Dominance of virus over host factors in Cross-Species activation of human cytomegalovirus early gene expression[J]. J Virol,2001,75(1):26-35.

[2] Ogawa H,Suzutani T,Baba Y,et al. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children:Independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations[J]. J Infect Dis, 2007,195(6):782-788.

[3] 许丽锋,张中洋,李秀玲,等. 人巨细胞病毒 gB 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中国生物制品学杂志,2004,17(5):284-286.

[4] 史文元,颜复生,曾焱华,等. 人巨细胞病毒 gB 和 ppl50 融合基因表达载体的构建及其免疫活性研究[J]. 中华实验和临床病毒学

3 讨 论

在体外,不同个体的精子凋亡差异较大^[7]。精子凋亡在不同生理或病理状况下表现不同,如果要将精子凋亡作为一项男性不育的检测指标,应严格控制受检对象的纳入标准,如存在静脉曲张等男性疾病,可能导致结果出现较大偏差。

笔者采用了胡静等^[3]等建立的流式细胞术检测法,进行了精子凋亡的检测。发现精子凋亡率在少精子症、弱精子症、精子畸形组中均有不同程度的升高。精子质量差的患者一般伴随有精子凋亡的异常,而异常的精子凋亡可能影响患者的生育结局。本研究检测的例数偏少,还需要通过增加标本量或采用荟萃分析的方法进行验证。

精子凋亡与男性不育有着非常密切的关系。但需要注意的是精子凋亡率的检测由于方法学的缘故个体差异较大,影响检测结果的影响因素较多,目前只建议作为精子生育力评估的一项参考指标。

参考文献

[1] 崔进,张雅洁,胡欣荣,等. 病理学[M]. 北京:北京科学出版社, 2007:16-17.

[2] 王雪松,张才田,崔毓桂,等. 采用 TUNEL 检测人精子凋亡及其初步应用[J]. 江苏医药,2008,34(1):91.

[3] 胡静,范立青. 精子凋亡检测技术的研究进展[J]. 中国医师杂志, 2007,9(11):1577-1579.

[4] 世界卫生组织. 世界卫生组织男性不育标准化检查与诊疗手册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2007.

[5] 世界卫生组织. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册 [M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2011.

[6] Baccetti B,Collo del G,Piomboni P,et al. Apoptosis in human ejaculated sperms cells[J]. J Submicrosc Cytol Pathol,1996,28(4): 587-596.

[7] 岳焕勋,李福平,蒋敏,等. 精液中凋亡精子与精液分析参数的相关性研究[J]. 中华男科学杂志,2007,13(11):1032-1034.

(收稿日期:2013-10-12)

杂志,2010,24(3):187-191.

[5] Lehner R,Meyer H,Mach M. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses[J]. J Virol,1989, 63(9):3792-3800.

[6] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005: 12-15.

[7] 王正茂,李琳,管文燕,等. 单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D 胞外区的真核表达及生物学活性分析[J]. 生物工程学报,2010,26(5):657-663.

[8] Jacobson MA,French M. Altered natural history of AIDS-related opportunistic infections in the era of potent combination antiretroviral therapy[J]. AIDS,1998,12 Suppl A:S157-163.

(收稿日期:2013-10-07)